**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การผลิตสารสตีวิโอไซด์โดยการเพาะเลี้ยงหญ้าหวานในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

**ผู้เขียน** นางสาวมัทนียา วังประภา

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา)

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์** อ. ดร. ศรีสุลักษณ์ ธีรานุพัฒนา

## บทคัดย่อ

นำปลายยอดหญ้าหวาน (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ขนาด 1.5 ซม มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เป็นเวลา 1 นาทีตามด้วยสารปฏิชีวนะ bactrim 0.4 % เป็นเวลา 25 นาที สารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 0.2 % เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ใน clorox 15% เป็นเวลา 15 นาทีและ clorox 5% เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ และแช่ใน citric acid 0.01% เป็นเวลา 3 นาที

นำยอดและใบอ่อนหญ้าหวานที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ร่วมกับ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.5, 1 และ 2 มก/ล รวม 16 ชุดความเข้มข้น โดยเลี้ยงยอดในสภาพมีแสง 16 ชม/วัน สำหรับใบแยกเลี้ยงในสภาพมีแสง 16 ชม/วัน และสภาพมืดตลอดเวลาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารสูตร MS ที่เติม BA 1 มก/ล สามารถชักนำให้เกิด multiple shoots ได้โดยมีจำนวนยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.5 ยอด/ชิ้นเนื้อเยื่อ ส่วนยอดที่เลี้ยงในอาหารที่มี NAA 2 มก/ล จะให้ยอดที่มีจำนวนรากเฉลี่ยสูงสุด 11 ราก/ชิ้นเนื้อเยื่อ การเพาะเลี้ยงใบพบว่าใบอ่อนที่เลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตร MS ที่เติม BA และ NAA ความเข้มข้นอย่างละ 2 มก/ล ทั้งในสภาพมีแสงและสภาพมืดให้ปริมาณแคลลัสสูงสุด

การสกัดสาร stevioside จากชิ้นส่วนพืชต่าง ๆ 6 ตัวอย่างคือ ยอดและรากจากธรรมชาติและจากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อรวมทั้งแคลลัสด้วยเทคนิค HPTLC (High Performance Thin Layer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Chromatography) พบว่ามีสาร stevioside ในเนื้อเยื่อยอดจากธรรมชาติและรากจากการเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อในปริมาณ 0.0188 และ 0.0012 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงยอดและยอดที่ชักนำให้เกิดรากแล้วในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sodium acetate ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 0.2 มก/ล ในสภาพมีแสง 16 ชม/วันเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่ายอดและยอดที่ชักนำให้เกิดรากแล้วที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sodium acetate 0.1 มก/ล มีการสะสมของสาร stevioside ปริมาณมากที่สุดคือ 0.0039 และ 0.0054 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้งตามลำดับ

การเพาะเลี้ยงยอดและยอดที่ชักนำให้เกิดรากแล้วใน stirred tank bioreactor ที่มีอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม sodium acetate 0.1 มก/ล ปริมาณ 3 ลิตร ในสภาพมีแสง 16 ชม/วันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีสาร stevioside ในเนื้อเยื่อยอดเท่านั้นคือ 0.0043 กรัม/กรัมน้ำหนักแห้งและไม่พบการสะสมของสาร stevioside ในเนื้อเยื่อยอดที่ชักนำให้เกิดรากแล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**Thesis Title** Stevioside Production by Cultured Stevia in Bioreactor

**Author** MS. Mattaneeya Wangprapa

**Degree** Master of Science (Biology)

**Thesis Advisor** Lect. Dr. Srisulak Dheeranupattana

## Abstract

Shoot tips of *Stevia rebaudiana* Bertoni were surfaced sterlized by immersed in 70% alcohol for 1 min then soaks in 0.4% bactrim for 25 minutes, 0.2% carbendazim for 10 minutes, 15% clorox for 15 minutes, 5% clorox for 10 minutes, respectively, and dipped in 0.01% citric acid for 3 minutes.

Shoots and leaves of *in vitro* plants were cultured on MS media supplemented with 16 factorial combinations of BA and NAA (0, 0.5, 1 and 2 mg/l) for 8 weeks. Shoot cultures were kept under fiuoresen light condition for 16 hours per day. Leave cultures were separated into 2 groups. The first group was kept under light for 16 hours and the second group was kept under dark condition all the time. Multiple shoot formation averaged of 4.5 shoots/explant occurred after 3 weeks of shoot culture on MS medium with 1 mg/l BA. The medium with 2 mg/l NAA could induce root formation with the highest average number of 11 roots/explant. The highest amount of calli were induced after culturing of *in vitro* leaves on MS media with 2 mg/l BA and 2 mg/l NAA under both light and dark conditions.

Analysis of stevioside production in natural shoots and roots, *in vitro* shoots and roots and calli using HPTLC (High Performance Thin Layer Chromatography) . It was found that the natural shoots and the *in vitro* roots contained 0.0188 and 0.0012 g/g dry weight of stevioside, respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Shoots and rooted-shoots were cultured in liquid MS medium supplemented with sodium acetate 0, 0.1 and 0.2 mg/l under 16 houra/day of light for 4 weeks. It showed that the medium with 0.1 mg/l sodium acetate induced the highest content of stevioside in the both shoot and rooted-shoot cultures (0.0039 and 0.0054 g/g dry weight, respectively).

Shoots and rooted-shoots were cultivated in stirred tank bioreactor with liquid MS medium supplemented with 0.1 mg/l sodium acetate (3 L) for 4 weeks under 16 hours/day of light for 4 weeks. It showed that only shoot culture had stevioside (0.0043 g/g dry weight), but there was no stevioside in rooted-shoot culture.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved